



TITLE:

# Studies on gut bacterial metabolisms of food-derived bioactive phytochemicals( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Watanabe, Hiroko

---

CITATION:

Watanabe, Hiroko. Studies on gut bacterial metabolisms of food-derived bioactive phytochemicals. 京都大学, 2020, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22494>

RIGHT:

許諾条件により本文は2021-03-22に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	渡 邊 寛 子
論文題目	Studies on gut bacterial metabolisms of food-derived bioactive phytochemicals (食品に由来する生理活性植物化学物質の腸内細菌代謝に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>健康寿命や生活の質の観点から、健康維持増進のための日常的な取り組みの重要度は高く、関心も増している。そのような取り組みとして、食生活の改善は最も重要な検討事項の一つである。近年、野菜やフルーツ、木の実など植物に由来する食品の健康効果に高い関心が寄せられているが、食品を構成する植物素材中の健康効果を惹起する化学物質は、植物体中において、ヒトに対する生理機能の種類や活性の強度が異なる前駆物質として貯蔵されている場合が多い。このような前駆物質の機能性化合物への変換には、ヒトの消化系だけでなく、腸内細菌による代謝変換が大きな役割を担っている。しかし、腸内細菌による植物由来化合物の機能性化合物への代謝の詳細は未だ十分に理解されていない。本論文は、腸内細菌におけるエラグ酸 (urolithin 前駆物質) および glucosinolate (isothiocyanate 前駆物質) の代謝に関与する新規酵素を特定したものである。</p> <p>第1章では、<i>Gordonibacter urolithinifaciens</i> DSM 27213 におけるエラグ酸代謝に関わる酵素を解明した。ポリフェノール化合物の一種である urolithin 類は、ザクロなどのフルーツやクルミなどの木の実などに含まれているエラジタンニンに由来する一群の腸内代謝物であり、腸内細菌がエラジタンニンからエラグ酸、urolithin 類を産生することが報告されている。また、いくつかの urolithin 類は、抗酸化、抗ガン、抗老化作用などの生理活性を示すファイトケミカルとして健康増進への寄与が期待されている。ヒト糞便由来腸内細菌 <i>G. urolithinifaciens</i> DSM 27213 はエラグ酸を urolithin M5 へと変換し、さらに urolithin M5 を urolithin M6 へ、urolithin M6 を urolithin C へと変換することが報告されている。しかし、変換に関与する酵素や反応機構などの詳細な分子メカニズムは未解明であった。</p> <p><i>G. urolithinifaciens</i> DSM 27213 の培養条件を検討し、エラグ酸代謝活性の誘導条件を明らかにした。次に、エラグ酸代謝活性誘導菌体と非誘導菌体に発現するタンパク質を網羅的に解析し、エラグ酸代謝活性誘導時に特異的に発現が増加した hydrolase (UroH)、molybdopterin-containing oxidoreductase (UroA1、UroB1)、4Fe-4S cluster binding domain containing protein (UroA2、UroB2)、hypothetical protein (UroA3、UroB3) をコードする遺伝子がゲノム上で近接して存在することを見いだした。</p> <p>エラグ酸の urolithin M5 への変換は、腸内における urolithin 類の生成経路の初発反応である。<i>G. urolithinifaciens</i> DSM 27213 のエラグ酸代謝活性誘導菌体と非誘導菌体に発現するタンパク質の比較から選抜した UroH について、大腸菌形質転換株を作出し、エラグ酸変換活性を評価した。その結果、本酵素がエラグ酸から urolithin M5 を生成する新規ラクトナーゼであることを見いだした。さらに、UroH を His-tag 融合タンパク質として過剰発現する大腸菌形質転換株を作成し、得られた菌体の無細胞抽出液よりアフィニティークロマトグラフィーによって本酵素を精製し、諸性質を評価した。その結果、本酵素が分子量 42,200 のモノマータンパク質であり、エラグ酸が</p>			

ら urolithin M5 への変換活性が pH 7.0–9.0、50 °C にて顕著となること、Ca<sup>2+</sup>により活性化されることを見いだした。本酵素の反応速度をエラグ酸濃度に対してプロットし特性を評価したところ、本酵素のエラグ酸に対する  $K_M$  値は  $0.5 \pm 0.2$  mM、 $k_{cat}$  値は  $1.0 \pm 0.1$  s<sup>-1</sup>、 $k_{cat}/K_M$  値は  $2 \pm 1$  mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> であった。

腸内において urolithin 類は、腸内細菌が触媒する urolithin M5 を起点物質としたフェノール性水酸基の脱水酸化反応によって生じる。*G. urolithinifaciens* DSM 27213 は、培養中や洗浄菌体を用いた反応では urolithin M5 および urolithin M6 の脱水酸化活性を示すが、無細胞抽出液では同様の活性が観察されなかった。そこで、本菌の無細胞抽出液を用いた urolithin 脱水酸化反応について、電子供与体として H<sub>2</sub> を添加した嫌気条件における電子伝達関連物質の添加効果を検討したところ、methylviologen の添加により urolithin M5 および urolithin M6 の脱水酸化反応が顕在化することを見いだした。また、methylviologen に加えて NADPH および FAD を添加することにより urolithin 脱水酸化活性が上昇することを見いだした。次に、urolithin M5 脱水酸化酵素を本菌より精製し、Native-PAGE により得られたバンドの N 末端アミノ酸配列解析を行った結果、精製酵素に UroA1、UroA2、UroB1、および UroB2 タンパク質が含まれ、また、UroA1 と UroA2 ならびに UroB1 と UroB2 がそれぞれ複合体として存在することを見いだした。すなわち、urolithin 脱水酸化反応に、UroA1・UroA2 複合体、および UroB1・UroB2 複合体が関与することを明らかにした。

第 2 章では、乳酸菌 *Lactobacillus farciminis* KB1089 の glucosinolate 代謝に関わる酵素系の解明に取り組んだ。アブラナ科野菜に含まれる glucosinolate は、硫黄および窒素原子を含む S-結合型配糖体であり、腸内細菌により代謝されることにより生じる isothiocyanate は、強い抗ガン作用を示すことが報告されているファイトケミカルである。これまで、腸内細菌による glucosinolate 代謝に関与する酵素は明らかになっていない。sinigrin などの glucosinolate を isothiocyanate へと変換する菌株として選抜した *L. farciminis* KB1089 に関して、sinigrin 変換および allylisothiocyanate 産生活性が sinigrin により誘導されることを見いだした。続いて、sinigrin 代謝活性誘導菌体と非誘導菌体に発現しているタンパク質の比較から、sinigrin 代謝への関与が示唆されるタンパク質として PTS sugar transporter (PttS) および aryl-phospho-β-D-glucosidase (PbgS) を見いだした。さらに、大腸菌や乳酸菌を宿主とする形質転換株の解析から、*L. farciminis* KB1089 における sinigrin 代謝に PttS（リン酸化を伴う sinigrin の取り込みに関与）および PbgS（リン酸化 sinigrin の細胞内での加水分解に関与）が機能していることを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 3 8 字×3 6 行で作成し、合わせて、3, 0 0 0 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、4 0 0 ~ 1, 1 0 0 words で作成し  
審査結果の要旨は日本語 5 0 0 ~ 2, 0 0 0 字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

食品による疾患予防や健康増進の重要性が、超高齢化社会における医療・介護費の負担増大にともなって高まっている。一方で、食品成分に由来する健康効果は、腸内細菌による物質変換を要する場合があるなど、疾患予防・健康増進技術の開発のためには、腸内細菌叢-宿主間相互作用の理解が不可欠である。しかし、腸内細菌における食品成分変換の分子機構に関しては理解が進んでいない現状があり、遺伝子・酵素レベルの微生物機能の解明が求められていた。本論文は、腸内細菌の食品由来化合物の機能性化合物への変換に関わる複数の新規酵素を明らかにしたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 腸内細菌 *G. urolithinifaciens* DSM 27213 のエラグ酸代謝活性がエラグ酸によって誘導されることを明らかにした。誘導菌体と非誘導菌体に発現するタンパク質を網羅的に解析し、比較することによって、エラグ酸代謝に関与する遺伝子クラスターを見いだした。
2. 腸内細菌におけるエラグ酸代謝の初発反応を触媒する新規酵素エラグ酸ラクトナーゼを特定した。また、本酵素の大腸菌過剰発現・精製系を構築し、至適反応条件を明らかにした。
3. *G. urolithinifaciens* DSM 27213 の無細胞抽出液を用いて、urolithin 脱水酸化酵素活性の顕在化に methylviologen を介した電子伝達系の導入が有効であることを見だし、本酵素反応の評価系を構築した。また、本評価系を用いることにより反応の詳細が十分に理解されていない腸内細菌によるフェノール性水酸基の脱水酸化反応に関して、urolithin の脱水酸化反応に関与する新規酵素を特定した。
4. 高い glucosinolate 代謝活性を有する乳酸菌 *L. farciminis* KB1089 を選抜し、本菌の glucosinolate 変換活性が基質によって誘導されることを明らかにした。誘導菌体と非誘導菌体に発現するタンパク質を比較することによって、本活性に関与する遺伝子クラスターを見いだした。また、これら遺伝子の発現解析を行い、本菌における phosphotransferase system を介した glucosinolate 代謝経路を解明した。

以上のように、本論文は、植物由来食品成分の腸内細菌代謝を解析し、urolithin ならびに glucosinolate 代謝に関与する酵素を解明したものであり、腸内細菌が宿主に与える影響の的確な理解と応用を支援するものである。従って、発酵生理学、応用微生物学、分子微生物科学、生体機能化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 2 年 2 月 7 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することと支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：          年          月          日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）